

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

Caracterização e seleção de estirpes de bactérias promotoras de
crescimento vegetal, visando à formulação de um inoculante biológico para
a cultura de sorgo

ANDRESS PACHECO PONTES

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Genética e Biologia Molecular.

Orientação: Profa. Dra. Luciane M. P. Passaglia

Co-orientação: Dra. Adriana Ambrosini

Porto Alegre, abril de 2019

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Microbiologia Agrícola do Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo INCT da Fixação Biológica do Nitrogênio.

Eu aprendi que todos querem viver no topo da montanha, mas toda a felicidade e crescimento ocorrem quando você está escalando-a. (William Shakespeare)

Agradecimentos

À Prof. Dra. Luciane Passaglia, pela excelente orientação, apoio, ideias e paciência (interminável).

À Dra. Adriana Ambrosini pelas ideias e discussões ao longo desse trabalho.

A todos os colegas de laboratório, pela amizade, pelas conversas motivadoras, pelos momentos divertidos.

À Fepagro, pelo suporte em análises e experimentos.

A todos os amigos que de uma forma ou de outra estiveram presentes ao longo desse período conturbado.

Ao PPGBM e CNPq/INCT, pelo apoio financeiro e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao meu pai, pelos inúmeros conselhos e palavras sábias, pelo carinho de pai e pela educação que me deu, além de tudo que me proveu.

À minha mãe, pelo carinho de mãe e pelo apoio incondicional.

Ao meu parceiro de vida, Luís Henrique, pelo apoio, pelo colo e por ser o cara que mais me ajuda a me levantar quando parece que deu tudo errado.

Resumo

O sorgo (*Sorghum bicolor*) está entre os cinco cereais mais cultivados no mundo, sendo utilizado atualmente para a alimentação de animais e humanos e na produção de etanol. Com o objetivo de aumentar a produtividade das culturas sem causar danos ao meio ambiente, buscaram-se alternativas ao uso de fertilizantes químicos. Uma dessas alternativas pode ser o uso de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (ou *Plant growth promoting bacteria*, PGPB), um grupo benéfico de micro-organismos encontrados na rizosfera, na superfície radicular ou em associação com as raízes. Neste estudo, foram isoladas e caracterizadas PGPBs associadas à cultura de sorgo com aptidão para uso na formulação de inoculantes agrícolas e seu efeito em promover o crescimento por meio de diferentes mecanismos foi testado. As linhagens bacterianas foram obtidas de amostras de solo rizosférico e raízes de plantas de sorgo coletadas em três locais de produção no Estado do Rio Grande do Sul. Os isolados foram identificados através da extração de DNA e amplificação parcial do gene 16S rRNA e avaliados por testes *in vitro* de solubilização de fosfato de cálcio, produção de sideróforos e compostos indólicos e formação de biofilme. Entre os 175 isolados bacterianos Gram negativos obtidos, a identificação revelou a ocorrência de 20 gêneros nas raízes e no solo rizosférico de sorgo, com predomínio dos gêneros *Burkholderia* e *Klebsiella*. Posteriormente, o isolamento foi direcionado para bactérias Gram positivas e um total de 123 isolados foram obtidos. Dentre todos os 298 isolados bacterianos obtidos, os três mais promissores tiveram sua identidade confirmada por sequenciamento do fragmento completo do gene 16S rRNA e foram utilizados em experimento em câmara de crescimento com plantas de sorgo. Esses isolados foram multiplicados em meio de cultura com e sem a adição de triptofano, uma vez que este composto estimula a produção de fitohormônios pela bactéria. A linhagem *Rhizobium miluonense* (VIA07) destacou-se entre as demais por ter proporcionado às plantas um maior crescimento em relação ao comprimento e peso seco da parte aérea, tanto no experimento realizado em substrato estéril (vermiculita e areia), quanto em solo, sendo que as bactérias multiplicadas na ausência de triptofano apresentaram os melhores resultados. Esse trabalho demonstrou que existem bactérias que são capazes de interagir de maneira positiva com plantas de sorgo e promoverem seu crescimento. Testes em campo poderão comprovar a eficiência desse isolado e sua utilização como inoculante para essa cultura, posteriormente.

Abstract

Sorghum (*Sorghum bicolor*) is among the five most cultivated cereals in the world, currently being used for animal and human food and for ethanol production. In order to increase the productivity of crops without causing damage to the environment, alternatives to the use of chemical fertilizers are sought. One of these alternatives may be the use of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), a beneficial group of microorganisms found in the rhizosphere, on the root surface or in association with the roots. In this study, PGPBs associated with sorghum culture with suitability for use in the formulation of agricultural inoculants were isolated and characterized, and their effect on promoting growth through different mechanisms was tested. The bacterial strains were obtained from samples of rhizospheric soil and roots of sorghum plants collected at three production sites in the State of Rio Grande do Sul. Isolates were identified through DNA extraction and partial amplification of the 16S rRNA gene and evaluated by tests in vitro calcium phosphate solubilization, production of siderophores and indolic compounds and biofilm formation. Among the 175 Gram negative bacterial isolates obtained, the identification revealed the occurrence of 20 genera in the roots and sorghum rhizospheric soil, with *Burkholderia* and *Klebsiella* genera predominating. Subsequently, the isolation was directed to Gram positive bacteria and a total of 123 isolates were obtained. Of the 298 bacterial isolates obtained, the three most promising had their identity confirmed by sequencing the complete fragment of the 16S rRNA gene and were used in a growth chamber experiment with sorghum plants. These isolates were multiplied in culture medium with and without the addition of tryptophan, since this compound stimulates the phytohormones production by the bacterium. The *Rhizobium miluonense* line (VIA07) stood out among the others because it gave the plants a greater growth in relation to the length and dry weight of the aerial part, both in the experiment carried out in sterile substrate (vermiculite and sand), as well as in soil. And the bacteria multiplied in the absence of tryptophan presented the best results. This work demonstrated that there are bacteria that are capable of interacting positively with sorghum plants and promote their growth. Field tests may prove the efficiency of this isolate and its use as an inoculant for this crop, later.

Sumário

1. Introdução Geral	8
1.1. Importância econômica do sorgo	8
1.2. Bactérias promotoras do crescimento vegetal	10
1.3. Importância do ácido indol-acético para o crescimento vegetal	13
1.4. Inoculantes à base de PGPB e a importância das formulações	14
2. Objetivos	16
3. Manuscrito em preparação	17
4. Considerações finais e perspectivas.....	49
5. Referências bibliográficas	50

1. Introdução Geral

1.1. Importância econômica do sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench, Figura 1) é uma gramínea originária do continente africano. Entre as espécies alimentares é uma das mais versáteis e mais eficientes, tanto do ponto de vista fotossintético, como em velocidade de maturação. Sua reconhecida versatilidade se estende desde o uso de seus grãos como alimento humano e animal (principalmente para ruminantes), matéria prima para a produção de álcool anidro, bebidas alcoólicas, colas e tintas. Além disso, há o uso de suas panículas para produção de vassoura e do colmo para a extração de açúcar (Embrapa Milho e Sorgo 2015).



Figura 1: Lavoura de sorgo. Fonte: John Deere

Em termos globais, o sorgo é a base alimentar de cerca de 500 milhões de pessoas em mais de 30 países. Somente arroz, trigo, milho e batata o superam em termos de quantidade de alimento consumido. O Rio Grande do Sul é um estado produtor e consumidor de sorgo, mas não detém a liderança na produção, como ocorrido até os anos 90. Atualmente, o Centro Oeste é a região brasileira de maior destaque na produção de sorgo, conforme demonstrado na Figura 2 (Embrapa Milho e Sorgo 2015).

REGIÃO/UF	ÁREA (Em mil ha)			PRODUTIVIDADE (Em kg/ha)			PRODUÇÃO (Em mil t)		
	Safra 15/16	Safra 16/17	VAR %	Safra 15/16	Safra 16/17	VAR. %	Safra 15/16	Safra 16/17	VAR %
	(a)	(b)	(b/a)	(c)	(d)	(d/c)	(e)	(f)	(f/e)
NORTE	25,1	17,6	(29,9)	1.687	1.902	12,7	42,3	33,5	(20,8)
TO	25,1	17,6	(29,8)	1.687	1.902	12,7	42,3	33,5	(20,8)
NORDESTE	97,1	114,2	17,6	942	1.073	13,9	91,4	122,6	34,1
PI	2,8	7,3	162,3	45	1.637	3.537,8	0,1	12,0	11.900,0
CE	0,7	0,7	-	1.346	1.915	42,3	0,9	1,3	44,4
RN	0,4	1,3	225,0	1.224	1.344	9,8	0,5	1,7	240,0
PB	0,3	1,3	332,0	800	1.200	50,0	0,2	1,6	700,0
PE	4,5	5,1	13,3	167	155	(7,2)	0,8	0,8	-
BA	88,4	98,5	11,4	1.006	1.068	6,2	88,9	105,2	18,3
CENTRO-OESTE	262,8	285,3	8,6	1.836	3.350	82,4	482,6	955,8	98,1
MT	49,0	37,6	(23,3)	1.915	2.312	20,7	93,8	86,9	(7,4)
MS	9,5	7,7	(18,9)	3.390	3.300	(2,7)	32,2	25,4	(21,1)
GO	201,0	235,0	16,9	1.700	3.500	105,9	341,7	822,5	140,7
DF	3,3	5,0	51,5	4.500	4.200	(6,7)	14,9	21,0	40,9
SUDESTE	185,0	185,6	0,3	2.102	3.021	43,7	388,8	560,7	44,2
MG	172,6	175,0	1,4	2.018	3.000	48,7	348,3	525,0	50,7
SP	12,4	10,6	(14,4)	3.266	3.368	3,1	40,5	35,7	(11,9)
SUL	9,0	9,0	-	2.929	3.000	2,4	26,4	27,0	2,3
RS	9,0	9,0	-	2.929	3.000	2,4	26,4	27,0	2,3
NORTE/NORDESTE	122,2	131,8	7,9	1.095	1.184	8,1	133,7	156,1	16,8
CENTRO-SUL	456,8	479,9	5,1	1.965	3.216	63,7	897,8	1.543,5	71,9
BRASIL	579,0	611,7	5,6	1.782	2.778	55,9	1.031,5	1.699,6	64,8

Figura 2: Dados econômicos da produção de sorgo nas diferentes regiões brasileiras. Fonte: Conab, 2017

Na comparação dos índices de produtividade, o Brasil encontra-se atrás de países como Argentina, China e Estados Unidos, porém, ainda se mantém acima da média mundial. No Brasil, a produtividade agrícola de sorgo aumentou de 2.191 kg/ha em 2006/07 para aproximadamente 3.000 kg nos últimos anos. As oscilações ou quedas dos índices de produtividade no Brasil podem estar relacionadas à existência de extensas áreas com uso de baixa tecnologia e fatores edafoclimáticos desfavoráveis (Embrapa Milho e Sorgo 2015).

O sorgo pode ser classificado, conforme suas diferentes finalidades, em quatro grupos: granífero, que possui porte mais baixo; sacarino, que possui porte mais alto e é utilizado para silagem ou produção de açúcar e etanol; forrageiro, para pastejo de gado; e vassoura, que é utilizado na produção de vassouras (Diniz 2010). Dos quatro grupos, o sorgo granífero é o que tem maior expressão econômica (Embrapa Milho e Sorgo 2015). Na última década, a área plantada com sorgo granífero tem oscilado entre 700 e 850 mil hectares. Entre 1976/77 e 2003/04, a área passou de 177 mil hectares para 898 mil hectares de cultivo. O recorde ocorreu na safra de 2003/2004, com 898 mil hectares (Conab 2014).

Um dos tipos de sorgo, o sorgo sacarino, tem ganhado espaço diante da atual crise energética e da preocupação com as emissões de gases de efeito estufa (Figueiredo *et al.* 2013). Além da cana-de-açúcar, o sorgo sacarino também pode ser empregado na

produção de etanol, representando uma ótima opção agronômica e industrial. O sorgo sacarino possui ciclo curto (quatro meses), sua produção pode ser totalmente mecanizada, os açúcares do seu colmo são diretamente fermentáveis e o bagaço pode ser utilizado como fonte de energia ou como forragem para alimentação de animais (Silva *et al.* 2012).

Atualmente, o sorgo sacarino é uma das espécies mais promissoras para o incremento da produção de etanol no Brasil. Entretanto, o caldo de sorgo sacarino possui uma composição de açúcares diferente do caldo formado a partir da cana-de-açúcar, com mais glicose e menos sacarose, e teor de amido até 0,5%, o que o torna menos apto à produção de açúcar cristal e, também, menos propenso à ação dos micro-organismos durante a fermentação. Ainda assim, possui um grande potencial para complementar a produção de etanol oriunda da cana-de-açúcar (Silva *et al.* 2012).

1.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal

As plantas estabelecem diversas relações com os organismos do solo e o balanço dessas interações resulta no aumento ou redução de *fitness*. A interação entre os micro-organismos e as plantas é estimulada pela troca de sinais moleculares na rizosfera – região de solo aderido às raízes vegetais com importância fundamental para a captação de água e nutrientes pelos micro-organismos (Alami *et al.* 2000). As plantas liberam entre 40 e 60% do carbono fixado por fotossíntese para as raízes e para os micro-organismos associados, através de mucilagens, compostos orgânicos e células radiculares (Keiluweit *et al.* 2015).

Os exsudatos liberados pelas raízes vegetais são uma rica fonte de energia para a microbiota, o que resulta em uma maior população de micro-organismos ao redor das raízes do que em outras porções de solo (Gray e Smith 2005). As bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB –*Plant Growth Promoting Bacteria*) formam um grupo benéfico e heterogêneo de micro-organismos que podem ser encontrados na rizosfera, na superfície das raízes ou em associação com as mesmas (Souza *et al.* 2015).

Alguns mecanismos bacterianos já são bastante conhecidos pela capacidade de favorecer o crescimento vegetal ou a defesa contra patógenos (Figura 3). A solubilização de nutrientes e a produção de reguladores de crescimento vegetal (fito-hormônios) estão entre os exemplos clássicos do potencial das bactérias como fertilizantes naturais. Nutrientes essenciais, como o nitrogênio e o fósforo, podem ser disponibilizados por meio da fixação biológica do nitrogênio atmosférico e da

solubilização de fosfatos, por exemplo (Estrada *et al.* 2013; Hungria *et al.* 2013; Chen *et al.* 2014). A produção de sideróforos tem sido associada à maior disponibilidade de ferro e à proteção contra patógenos (Dimkpa *et al.* 2009; Loaces *et al.* 2011). A capacidade de produzir fito-hormônios pelas PGPBs também possui uma grande importância devido à influência dessas moléculas sobre o metabolismo das plantas (Spaepen *et al.* 2007; Jaillais e Chory 2010).

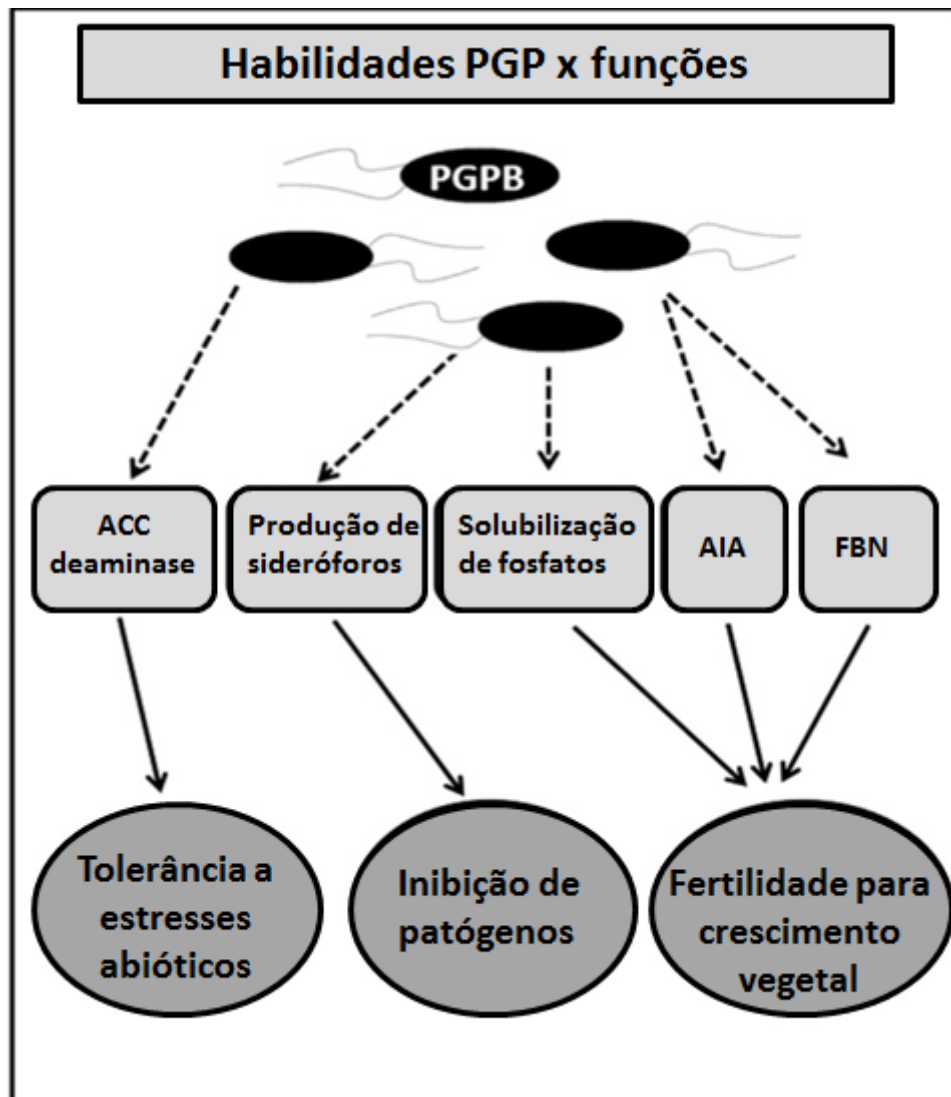


Figura 3: Habilidades das PGPB para promoção de crescimento e suas respectivas funções. Abreviaturas: PGP: *plant-growth promoting*, AIA: ácido indol-acético, FBN: fixação biológica de nitrogênio. Fonte: Souza *et al* 2015 (adaptado).

A presença de um ou mais processos benéficos tem sido considerada uma ferramenta importante na seleção de “boas” PGPB. Entretanto, os efeitos positivos são dependentes de uma complexa rede de interações biológicas e ambientais. As

características físico-químicas do solo, as diferentes variedades vegetais e as outras populações de organismos influenciam grandemente o tipo e intensidade do efeito sobre as plantas (Souza *et al.* 2015).

Acredita-se que, além de promover o crescimento das plantas, as PGPB devem ser eficientes em colonizar o solo ou a superfície das raízes, sobrevivendo e se multiplicando com eficiência frente à competição com outros componentes da microbiota. Nesse contexto, estima-se que a produção de biofilme seja um mecanismo importante para a proteção contra danos ou estresses ambientais. A sobrevivência e a capacidade de competição das bactérias inoculadas são essenciais, sobretudo, até o momento da colonização das raízes ou o adequado estabelecimento das bactérias na rizosfera (Haggag e Timmusk 2008). As bactérias que habitam a rizosfera, entre elas as PGPB, são frequentemente encontradas formando micro-colônias ou estruturas semelhantes a biofilmes nas raízes das plantas (Morris e Monier 2003, Figura 4).

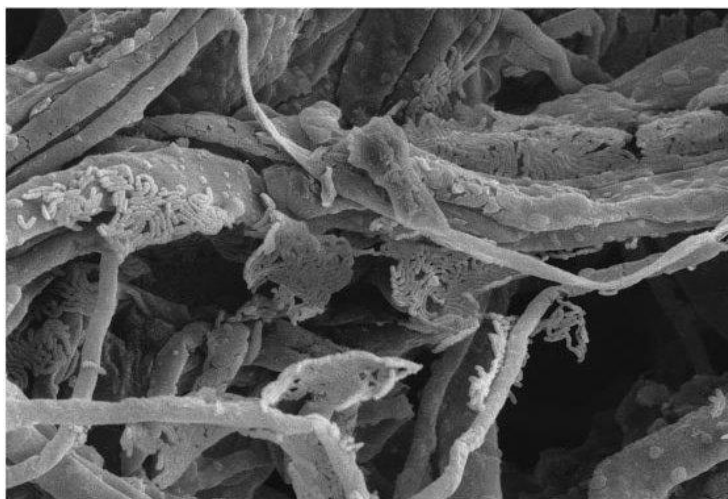


Figura 4. Colônias bacterianas formando biofilmes em raízes de plantas (Fonte: Nurmiaho-Lassila *et al.* 1997).

Os biofilmes são conjuntos de colônias microbianas concentradas em uma interface e cercadas por substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos próprios micro-organismos (Hall-Stoodley *et al.* 2004). De modo geral, os biofilmes microbianos possuem algumas funções conhecidas, sendo elas: a proteção das bactérias contra substâncias antimicrobianas e estresses ambientais, ação de mediador na disponibilidade de nutrientes e controle de substâncias tóxicas, entre outros processos (Rafique *et al.* 2015).

A composição do biofilme pode variar, mas, de modo geral, ele é composto de água, células bacterianas e uma matriz extracelular composta, principalmente, por exopolissacarídeos (EPS). Essa matriz celular pode representar até 90% da composição do biofilme, que, além de EPS, pode conter pequenas quantidades de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Sutherland 2001). Esses polímeros são responsáveis pela imobilização das bactérias na matriz, estabilidade mecânica do biofilme, coesão com a interface onde o biofilme se localiza e funcionalidade da comunidade bacteriana envolvida (Flemming e Wingender 2010).

1.3. Importância do ácido indol-acético para o crescimento vegetal

Dentre as diferentes classes de hormônios vegetais existentes, as auxinas determinam aspectos dentre os mais básicos no crescimento das plantas (Morshed *et al.* 2006) e são conhecidas por induzirem respostas rápidas e prolongadas nas plantas (Scarcella *et al.* 2017). Atualmente, algumas auxinas podem ser produzidas sinteticamente e utilizadas para controlar o crescimento de plantas, como é o caso do ácido 2,4 diclorofenoxiacético, que age como inibidor do alongamento radicular e é utilizado como um potente herbicida (Simon e Petrásek 2011).

O ácido indol-acético é o principal exemplo de auxina natural, com diversas funções no desenvolvimento das plantas (Ludwig-Muller e Epstein, 1991; Teale *et al.* 2006). Ele não apenas é produzido por plantas, mas também por alguns micro-organismos, tais como bactérias e fungos (Reineke *et al.* 2008). Em bactérias, é produzido juntamente com outros compostos indólicos e é um regulador de crescimento bastante explorado entre as PGPB (Santner e Estelle 2009; Contesto *et al.* 2010).

Entretanto, algumas bactérias produzem auxinas com propósitos que são nocivos para as plantas, seja provocando um distúrbio no balanço hormonal destas ou pela formação de tumores e galhas nas mesmas (Jameson 2000).

O ácido indol-acético pode ser produzido em diferentes rotas metabólicas a partir do aminoácido triptofano. Este é convertido em Indol-3-acetamida (IAM) por intermédio da enzima Triptofano-2-monooxigenase e, posteriormente, convertido a ácido indol-acético por intermédio da enzima IAM-hidrolase (Figura 5). As rotas que utilizam triptofano são conhecidas como “dependentes de triptofano” (trp-dependentes) e também há rotas que não necessitam da presença de triptofano, conhecidas como “independentes de triptofano” (trp-independentes). Ambas podem ocorrer tanto em

plantas quanto em bactérias, podendo ser encontrados os dois tipos em uma mesma bactéria (Patten e Glick 2002).

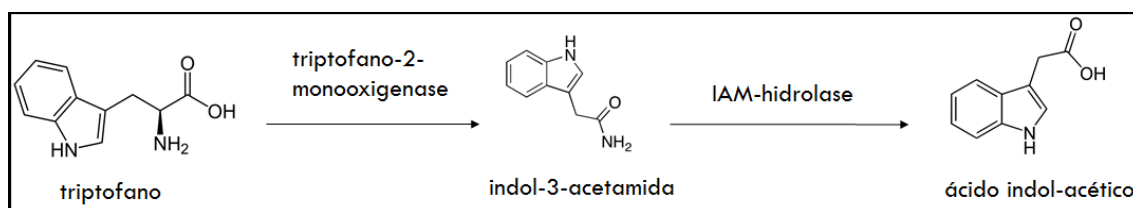


Figura 5: Rota de produção de ácido indol acético (Trp dependente).

A importância do ácido indol-acético se deve, essencialmente, ao estímulo radicular, favorecendo a proliferação de raízes adventícias para maior captação de água e nutrientes. Entretanto, as bactérias do solo são capazes de produzir diversos outros hormônios vegetais, como ácido abscísico, ácido salicílico, jasmonato, citocinina, giberelina e etileno. A complexa e intrincada regulação hormonal faz com que pequenas variações na quantidade de hormônios influenciem negativa ou positivamente o crescimento e desenvolvimento das plantas (Santner e Estelle 2009; Contesto *et al.* 2010).

O ácido indol-acético pode, ainda, agir como indutor do alongamento celular através, por exemplo, do aumento do conteúdo osmótico nas células e da diminuição da pressão sobre a parede celular. Também pode ser responsável pela inibição ou atraso da abscisão das folhas e indução do florescimento e frutificação (Zhao 2010).

1.4. Inoculantes à base de PGPB e a importância das formulações

Inoculantes microbianos – ou biofertilizantes – são produtos biológicos que contêm micro-organismos vivos. Um inoculante microbiano pode ser definido como o produto final de uma formulação contendo um transportador e um agente bacteriano ou um consórcio de micro-organismos (Bashan *et al.* 2014). Os carreadores são substratos abióticos (sólido, líquido ou gel) usados em processos laboratoriais ou industriais de preparo de formulações, as quais contêm micro-organismos encapsulados, em meio líquido, orgânico, inorgânico ou polimérico (Bashan *et al.* 2014). De forma sucinta, podemos considerar que um “bom” inoculante deverá conter não apenas os micro-organismos benéficos, mas, também, as condições apropriadas para a sobrevivência deles no produto final, o que se refere ao chamado “tempo de prateleira”. Sobretudo,

para cumprir sua finalidade, a bactéria inoculada deve estar protegida em uma formulação que favoreça sua proliferação na rizosfera (Jayaraman *et al.* 2014).

O uso de inoculantes na agricultura, além de evitar a contaminação da água pelo nitrato proveniente da adubação nitrogenada, pode contribuir para uma menor emissão de gases de efeito estufa, representando, na cultura da cana-de-açúcar, por exemplo, uma economia de pelo menos 30 kg de nitrogênio ao ano por hectare. Além dos ganhos ambientais, o uso de inoculantes torna-se adequado para sistemas de produção em que a legislação não permite o uso de agroquímicos, como em sistemas orgânicos (Bashan *et al.* 2014; MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, <http://www.agricultura.gov.br/>).

As formulações líquidas e a inoculação de sementes representam a forma habitual de produção e aplicação, uma vez que seus materiais são de baixo custo (em relação à turfa, por exemplo) e, portanto, mais acessíveis aos pequenos agricultores (Albareda *et al.* 2008). Entretanto, as taxas de sobrevivência dos micro-organismos nesse tipo de formulação são menores devido à ausência de condições protetivas, inclusive, contra contaminação durante o armazenamento, transporte e aplicação (Bashan *et al.* 2002). Recentemente, bactérias produtoras de biofilmes têm sido consideradas importantes candidatas à formulação de inoculantes para plantas (Seneviratne *et al.* 2008), uma vez que o próprio biofilme pode atuar como um carreador (Malusá *et al.* 2012).

A soja é uma das culturas que tradicionalmente mais recebe aporte de nutrientes provenientes de inoculantes agrícolas. Para esta cultura são normalmente utilizadas estirpes de *Bradyrhizobium*, que auxiliam na fixação de nitrogênio atmosférico (Conley e Christmas, 2015). Para o trigo, têm sido testados inoculantes contendo estirpes de *Paraburkholderia tropica* (Bernabeu *et al.* 2018) e, tanto para o trigo quanto para outras gramíneas cultivadas, como o milho e a cana-de-açúcar, são utilizados inoculantes contendo estirpes de *Azospirillum brasilense* (Reis *et al.* 2009; Morais *et al.* 2016; Vogel *et al.* 2013).

Com base nas informações apresentadas, sabendo que a cultura de sorgo carece de tecnologias que aumentem seu rendimento, se torna interessante estudar alternativas viáveis e que não aumentem os danos ambientais causados pelo excesso do uso de fertilizantes químicos. Os benefícios das PGPB são bem conhecidos e estabelecidos para diversas culturas agrícolas, porém pouco se sabe sobre as PGPB que se associam com a cultura do sorgo.

2. Objetivos

Objetivo geral

Caracterização e seleção de linhagens bacterianas isoladas da rizosfera e raízes de sorgo que tenham potencial para a promoção de crescimento de plantas e para a utilização na formulação de inoculantes biológicos, visando o aumento da produtividade e a redução do uso de adubação química nessa cultura.

Objetivos específicos

- Isolamento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas do solo rizosférico e raízes de sorgo cultivado em diferentes localidades do Estado do Rio Grande do Sul;
- Identificação das linhagens isoladas por meio de PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA;
- Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, produção de sideróforos, produção de reguladores de crescimento vegetal (compostos indólicos) e formação de biofilme entre os diferentes isolados bacterianos;
- Seleção de linhagens com diferentes características benéficas para experimentos de inoculação de sorgo em câmara de crescimento;
- Determinação do ponto de maior produção de ácido indol-acético pelas bactérias selecionadas, através do acompanhamento por curvas de crescimento na presença e ausência de triptofano;
- Avaliação do efeito da produção de ácido indol-acético pelas bactérias selecionadas no crescimento de plantas de sorgo.

3. Manuscrito em preparação para ser submetido à revista *Applied Soil Ecology*

Caracterização e seleção de estirpes de bactérias promotoras de crescimento vegetal, visando à formulação de um inoculante biológico para a cultura de sorgo

Pontes¹, A., Ambrosini, A.¹, Lisboa, B.², Dalmolin, D.³, Passaglia, L.M.P¹

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 9500, Bento Gonçalves Ave., Porto Alegre, 91501-970, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Departamento de Agricultura Pesquisa e Diagnóstico, Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul, 570, Rua Gonçalves Dias, Porto Alegre, 90130-060, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 9500, Bento Gonçalves Ave., Porto Alegre, 91501-970, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor correspondente: E-mail: luciane.passaglia@ufrgs.br

Abstract

Sorghum (*Sorghum bicolor*) is among the five most cultivated cereals in the world. This crop is currently used for animal and human food and ethanol production. In order to increase crop productivity without causing environmental damage, alternatives to the use of chemical fertilizers are sought. One of these alternatives can be the use of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), a beneficial group of microorganisms found in the rhizosphere, root surface or in association with the roots. In this study PGPB associated with sorghum culture that have suitability for use in formulating agricultural inoculants were isolated and characterized and their effects of promoting growth through different mechanisms were tested. The strains were obtained from samples of rhizospheric soil and roots of sorghum plants collected in three production locations in the Rio Grande do Sul State. They were identified through the DNA extraction and partial amplification of the 16S rRNA gene and evaluated by *in vitro* tests for calcium phosphate solubilization, siderophores and indolic compounds production and biofilm formation. Among the 175 Gram negative bacterial strains, the identification revealed the occurrence of 20 bacterial genera in the roots and sorghum rhizospheric soil, with predominance of *Burkholderia* and *Klebsiella*. Subsequently, isolation was directed to Gram positive, and a total of 123 strains were obtained. Among the 298 isolates

obtained, the three more promising had confirmed their identity by sequencing the complete fragment of the 16S rRNA gene and were used in a growth chamber experiment with sorghum plants. These isolates were multiplied in culture medium with and without the addition of tryptophan, since this compound stimulates the production of phytohormones by the bacteria. The bacterial strain belonging to the genus *Rhizobium* (VIA07) stood out among the others because it gave the sorghum plants a greater growth in relation to the length and weight of the aerial part. This isolate was also tested in a soil substrate assay. The inoculated plants presented significant growth. Treatment without tryptophan represented the most promising results.

Palavras-chave: PGPB, sorgo, inoculante, ácido indol-acético

4. Considerações finais e Perspectivas

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que o isolado bacteriano selecionado se mostrou bastante promissor como um promotor de crescimento de sorgo. Quando testado em um substrato estéril, sem a presença de qualquer outro micro-organismo, as plantas inoculadas, que haviam recebido apenas 25% da dose de nutrientes, tiveram um crescimento equivalente ao das plantas não-inoculadas que receberam 100% da dose de nutrientes.

Quando testado em solo, este isolado proporcionou um crescimento considerado significativo das plantas de sorgo. Este fato demonstra que a bactéria foi capaz de competir com os demais micro-organismos presentes no solo e se manteve ativa beneficiando a planta. Além disso, foi possível observar, em ambos os ensaios realizados, que a utilização do isolado bacteriano proporciona uma economia no uso de fertilizantes químicos e uma consequente redução de impactos ambientais, visto que sua utilização permite uma redução de 75% da dose de nutrientes aplicada. O isolado também estimulou a absorção de macro nutrientes pelas plantas, o que certamente colabora para a sua ação de promoção de crescimento vegetal.

Este isolado foi identificado com pertencente ao gênero *Rhizobium*, que tradicionalmente associa-se a plantas leguminosas. Entretanto, tem sido relatado recentemente a capacidade de associação de bactérias deste gênero com gramíneas como o arroz, o trigo e a cevada (Iyer e Rajkumar 2017). Este estudo demonstra que com o sorgo este tipo de relação também pode ocorrer.

Outro resultado interessante deste estudo também indica uma economia na produção de grãos. O excesso no suprimento de triptofano mostrou-se ser capaz de reduzir o crescimento das plantas. No caso de um resultado contrário, a necessidade de adição de triptofano a um inoculante tornaria o seu processo de produção mais oneroso e, por consequência, o preço do produto final seria mais elevado.

Após a escolha do micro-organismo, pode-se trabalhar na formulação do inoculante comercial. Para o sucesso deste produto é muito importante a escolha do carreador mais adequado, o qual vai conduzir os micro-organismos ao seu local de ação. Dentre as alternativas mais promissoras está a utilização de biopolímeros, que proporcionam proteção aos micro-organismos contra fatores bióticos e abióticos e sua liberação gradual junto das sementes. Uma vez obtida uma formulação, esta será testada em um ensaio a campo, no qual se observará se o inoculante produzido refletirá em um aumento na produtividade de sorgo.

5. Referências bibliográficas

Alami Y; Achouak W; Marol C; Heulin T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. Appl. Environ. Microbiol. 66:3393-3398, 2000.

Albareda M; Rodriguez-Navarro D.N; Camacho M; Temprano F.J. Alternative to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. Soil Biol Biochem 40:2771–2779, 2008.

Bashan Y, Hernandez J.P, Leyva L.A, Bacilio M. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. Biol Fertil Soils 35:359–368, 2002.

Bashan Y, de-Bashan L, Prahbu S.R, Hernandez J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant Soil 378:1–33, 2014.

Bernabeu, P.R., García, S.S., López, A.C., Vio, S.A., Carrasco, N., Boiardi, J.L., Luna, M.F. Assessment of bacterial inoculant formulated with *Paraburkholderia tropica* to enhance wheat productivity. World J Microbiol Biotechnol, 2018.

Chen Y, Fan J.B, Du L, Xu H, Zhang Q.Y and He Y.Q. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. Appl Soil Ecol 84:235-244, 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 12 de outubro de 2017

Conley, S.P., Christmas, E.P. Utilizing inoculants in a corn-soybean rotation. Purdue Agronomy, Purdue University, 2015.

Contesto C, Milesi S, Mantelin S, Zancarini A, Desbrosses G, Varoquaux F, Bellini C, Kowalczyk M, Touraine B. The auxin-signaling pathway is required for the lateral root

response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* (2010) 232:1455–1470, 2010.

Dimkpa C.O, Merten D, Svatos A, Büchel G and Kothe E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol* 5:687-1696, 2009.

Diniz, G.M.M. Produção de Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) Aspectos Gerais. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife, PE, 2010.

EMBRAPA Milho e Sorgo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Sorgo/CultivadoSorgo/> **9ª edição**, Jul/2015

Estrada G.A, Baldani V.L.D, Oliveira D.M, Urquiaga S., Baldani J.V. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil* 369:115-129, 2013.

Figueiredo M.V.B. Tecnologias potenciais para uma agricultura sustentável. Recife, PE: Instituto Agrônomo de Pernambuco – Ipa/Emater/Seagri-AL, 1ª edição, 356p, 2013.

Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Rev. Microbiol.* 8, 623-633, 2010.

Gray E.J, Smith D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37, 395-412, 2005.

Haggag W.M., Timmusk S. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *J Appl Microbiol* 104:961–969, 2008.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology Journal.*; 2:95-108, 2004.

Hungria M, Nogueira M.A, Araujo R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. *Biol Fertil Soils* 49:791-801, 2013.

Iyer, B., Rajkumar, S. Host specificity and plant growth promotion by bacterial endophytes. *Current Research in Microbiology and biotechnology*, vol. 5, No. 2: 1018-1030, 2017.

Jaillais Y, Chory J. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol.* 17(6): 642–645, 2010.

Jameson P.E. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. *Plant Growth Reg* 32: 369–380, 2000.

Jayaraman D, Gilroy S, Ane J.M. Staying in touch: mechanical signals in plant–microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol* 20:104–109, 2014.

Keiluweit M, Bougoure J.J, Nico P.S, Pett-Ridge J, Weber P.K, Kleber M. Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nat Clim Chang* 5:588–595, 2015.

Loaces I, Ferrando L, Scavino A.F. Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microb Ecol* 61:606-618, 2011.

Ludwig-Muller J., Epstein E. Occurrence and in vivo biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* 97: 765–770, 1991.

Malusá, E; Sas-Paszt, L.; Ciesielska, J. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 491206, 2012.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento,
<http://www.agricultura.gov.br/>

Morais, T.P., Brito, C.H., Brandão, A.M., Rezende, W.S. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 2, p. 290-298, 2016.

Morris, C.E.; Monier, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 41:429–453, 2003.

Morshed, M.H., Hossain, M.S., Habib, M.A., Ahmed, M.M., Ibrahim, M., Ali, M.U., Islam, M.A. The effect of plant hormone indole acetic acid (IAA) on hematological and biochemical parameters in mice. *Bangladesh J Physiol Pharmacol*, 21(1/2): 5-8, 2006.

Nurmiaho-Lassila, E.L, Timonen S, Haahtela K, Sen R. Bacterial colonization patterns of intact *Pinus sylvestris* mycorrhizospheres in dry pine forest soil: an electron microscopy study. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 1017–1035, 1997.

Patten C.L., Glick B.R. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Canadian J Microbiol* 48: 635–642, 2002.

Rafique M., Hayat K., Mukhtar T., Amna, Khan A.A., Afridi M.S., Hussain T., Suntan T., Munis M.F.H., Imran M; Chaudhary H.J. Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, A. Méndez-Vilas, Ed. 2015.

Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H., Kahmann, R., Basse, C.W. Indole3acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol Plant Pathol* 9:339-55, 2008.

Reis, V.M., Pereira, W., Hipólito, G.S. Métodos de aplicação de bactérias diazotróficas em cana-planta para fins de determinação de eficiência agronômica. Comunicado Técnico 118 Embrapa, Seropédica, RJ, 2009.

Santner A, Estelle M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. 459:1071-1078, 2009.

Seneviratne G, Zavahir J.S., Bandara W.M.M.S., Weerasekara M.L.A.W. Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, no. 6, pp.739–743, 2008.

Silva, A.F. Sistema Embrapa de produção agroindustrial de sorgo sacarino para bioetanol: Sistema BRS1G – Tecnologia Qualidade Embrapa. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.120 p., 2012.

Simon, S., Petrásek, J. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science* 180, 454–460, 2011.

Spaepen S, Vanderleyden J and Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425-448, 2007.

Sutherland I.W. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9, 2001.

Scarcella, A. S. A.; Bizarria, J., Bastos, R., Gaspar, R.. Temperature, pH and carbon source affect drastically indole acetic acid production of plant growth promoting yeasts. *Braz. J. Chem. Eng.*, vol.34, n.2, pp.429-438, 2017.

Souza, R. de; Ambrosini, A; Passaglia, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.

Teale, W.D., Paponov, I.A., Palme, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, vol. 7, 2006.

Vogel, G.F., Martinkoski, L., Bittencourt, H.V.H., Grillo, J.F. Agronomic performance of *Azospirillum brasilense* on wheat crops. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, Guarapuava-PR, v.6, n.3, p.111-119, 2013.

Zhao, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol.* June 2; 61: 49–64, 2010.